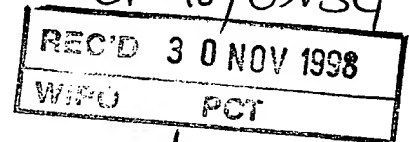


**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 98/6134
09/509608

Bescheinigung

Die SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT in Berlin/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und
dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter
Hefen"

am 30. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

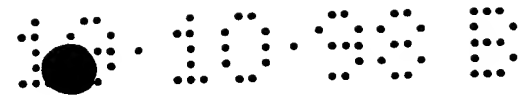
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, C 12 P und C 07 J der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 28. September 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Patenzzeichen: 197 44 212.9

Rixner



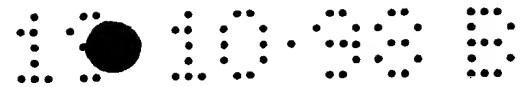
Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen und Plasmide zur Transformation von Hefen.

Ergosterol ist das Endprodukt der Sterol-Synthese in Hefen und Pilzen. Die wirtschaftliche Bedeutung dieser Verbindung liegt zum einen in der Gewinnung von Vitamin D₂ aus Ergosterol über UV-Bestrahlung, zum anderen in der Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation, ausgehend von Ergosterol. Squalen wird als Synthesebaustein für die Synthese von Terpenen benutzt. In hydrierter Form findet es als Squalan Verwendung in Dermatologie und Kosmetik sowie in verschiedenen Derivaten als Inhaltsstoff von Haut- und Haarpflegemitteln. Ebenso von wirtschaftlicher Bedeutung sind die Zwischenprodukte des Ergosterol-Stoffwechselweges. Als wichtigste seien hier Farnesol, Geraniol und Squalen genannt. Weiterhin wirtschaftlich nutzbar sind Sterole, wie z.B. Zymosterol und Lanosterol, wobei Lanosterol Roh- und Synthesepivot für die chemische Synthese von Saponinen und Steroidhormonen ist. Wegen seiner guten Hautpenetration und Spreadingeigenschaften dient Lanosterol als Emulsionshilfs- und Wirkstoff für Hautcremes.

Die Gene des Ergosterol-Stoffwechsels in Hefe sind weitgehend bekannt und kloniert, so z.B. die HMG-CoA-Reduktase (*HMG1*) (Basson et al. (1988)), die Squalensynthetase (*ERG 9*) (Fegueur et al. (1991)), die Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) (Yu et al. (1996)) und die Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrositz et al. (1991)). Squalensynthetase katalysiert die Reaktion von Farnesylpyrophosphat über Presqualenpyrophosphat zu Squalen. Die Reaktionsmechanismen von Sterolacyltransferase sind nicht vollständig geklärt. Eine Überexpression der Gene dieser genannten Enzyme wurde bereits versucht, führte jedoch zu keiner nennenswerten Erhöhung der Ergosterol-Menge. Im Fall der *HMG1*-Überexpression wurde die Überproduktion von Squalen beschrieben, hierzu wurden zusätzlich Mutationen zur Unterbrechung des nach Squalen folgenden Weges eingeführt (EP-0 486 290).

35 Die Überproduktion von Geraniol und Farnesol wurde ebenfalls beschrieben, hier erfolgte allerdings keine Überexpression von Genen des Ergosterol-Stoffwechsels, sondern eine Unterbrechung des Reaktionsweges in Richtung Geraniol- und Farnesol-Bildung (EP-0313 465).



Spezifische Inhibitoren der Ergosterolbiosynthese können ebenfalls zur Anhäufung größerer Mengen bestimmter Zwischenprodukte führen, z.B. Allylamine, die die Umwandlung von Squalen zu Squalenepoxid verhindern. Dadurch werden große Mengen (bis zum 600fachen des Normallevels) Squalen angehäuft (Jandrositz et al., (1991)).

Zwar wurden durch die Verwendung von Inhibitoren eine große Anhäufung von z.B. Squalen erreicht, doch dürfte sich die Zugabe dieser Substanzen als nachteilig erweisen, da selbst geringe Mengen die gleiche Wirkung im Organismus entfalten, so daß eine Herstellung von Produkten der Ergosterolbiosynthese auf dem Weg der Überproduktion von Vorteil ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, die hierfür notwendigen Mikroorganismen wie Hefestämme, die erhöhte Mengen an Ergosterol bzw. hierfür notwendige Zwischenprodukte zu synthetisieren und die zur Transformation der Hefestämme notwendigen Plasmide bereitzustellen.

Es wurde nun gefunden, daß man die Menge an Ergosterol und dessen Zwischenprodukten steigern kann, wenn die Gene der *HMG1* (Basson et al., (1988)), *ERG9* (Fegueur et al., (1991)), *Current Genetics* 20: 365-372), *SAT1* (Yu et al., (1996)) und *ERG1* (Jandrositz et al. (1991)) in Mikroorganismen wie z.B. Hefen in veränderter Form eingebracht werden, wobei die Gene entweder einzeln auf einem Plasmid oder in Kombination auf einem oder mehreren Plasmiden lokalisiert sind und gleichzeitig oder nacheinander in den Wirt gebracht werden können.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem mehrere geeignete Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form inseriert sind
oder
- b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form inseriert ist,
- c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a) transformiert



werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,

- d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
- e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
- f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

a-i) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*),
 - ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
 - iii) das Gen der Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
- und
- iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG 1*),

oder

a-ii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
- und
- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*),

oder

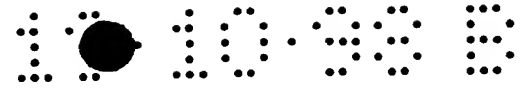
a-iii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
- und
- iii) das Gen der Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),

oder

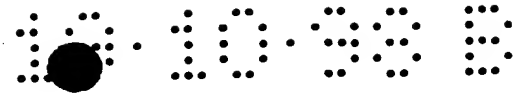
a-iv) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
- und



- iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
a-v) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- 5 ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
und
iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
oder
a-vi) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- 10 ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
a-vii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- 15 iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der unter a-i) genannten Gene insertiert ist,
und
c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a-i) bis a-vii) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
- 20 d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 25
30
35

Auf den unter a-ii), a-iii) und a-v) aufgeführten Plasmiden kann zusätzlich das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) und auf dem unter a-ii) aufgeführten Plasmid kann



zusätzlich das Gen der Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) insertiert sein. Diese Plasmide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Unter Zwischenprodukten sind Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol, insbesondere Sterole mit 5,7-Dienstruktur, zu verstehen.

Die verwendeten Plasmide sind vorzugsweise das Plasmid YEpH2, das den mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und den *TRP*-Terminator (s. Fig. 1) enthält, das Plasmid YDpUHK3, das den mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und den *TRP*-Terminator, das Gen für die Kanamycin-Resistenz und das *ura3* Gen enthält (s. Fig. 2) und das Plasmid pADL-SAT1, das das *SAT1*-Gen und das *LEU2*-Gen aus YEp13 enthält.

Diese Plasmide und deren Verwendung zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten wie Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol, insbesondere Sterole mit 5,7-Dienstruktur, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Als Wirt für die Einführung der erfindungsgemäßen Plasmide kommen im Prinzip alle Mikroorganismen, insbesondere Hefen in Frage.

Bevorzugt ist die Spezies *S. cerevisiae*, insbesondere der Stamm *S. cerevisiae* AH22.

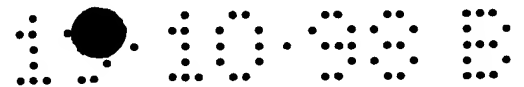
Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch der Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, der eines oder mehrerer der im Verfahren unter a-i) genannten Gene enthält.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist der Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, der das Plasmid pADL-SAT1 enthält.

Weiterhin bevorzugt ist die kombinierte Transformation von Mikroorganismen mit den Plasmiden pADL-SAT1 und YDpUHK3, insbesondere Hefen wie *S. cerevisiae* AH22.

Insgesamt gesehen wird der Fluß im Ergosterol-Stoffwechselweg wie folgt beeinflusst:

Der Fluß in Richtung Ergosterol wird maximiert, indem die Aktivität von mehreren Flaschenhals-Enzymen gleichzeitig verstärkt wird. Dabei spielen verschiedene



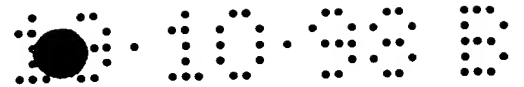
Enzyme eine entscheidende Rolle, wobei die Kombination von Deregulation bzw. Überexpression den entscheidenden Durchbruch zur Ergosterolausbeutesteigerung bringt. Als Kombination werden die Enzyme bzw. deren Gene *HMG1* (Basson et al., (1988)), *ERG9* (Fegueur et al., (1991)), Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) (Yu et al. (1996)) und/ oder Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrositz et al. (1991)) in einen Hefestamm in *veränderter* Form eingebracht, wobei das Einbringen der Gene mit einem oder mehrerer Plasmide erfolgt, wobei auf dem (den) Plasmid(en) die DNA-Sequenzen entweder einzeln oder in Kombination enthalten sind.

"Verändert" bedeutet im Falle des Gens *HMG1*, daß von dem entsprechenden Gen nur der katalytische Bereich ohne die membrangebundene Domäne exprimiert wird. Diese Veränderung wurde bereits beschrieben (EP-0486 290). Ziel der Veränderung von *HMG1* ist es, die Feed-back-Regulation durch Intermediate der Ergosterolbiosynthese zu verhindern. Sowohl *HMG1* als auch die beiden anderen genannten Gene werden so auf gleiche Weise der transkriptionellen Regulation entzogen. Dazu wird der Promotor der Gene durch den "mittleren" *ADH1*-Promotor ersetzt. Dieses Promotorfragment des *ADH1*-Promotors zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen et al., (1995)), so daß die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft. Die bei der Überexpression entstehenden Produkte können in Biotransformationen bzw. anderen chemischen und therapeutischen Zwecken verwandt werden, z.B. die Gewinnung von Vitamin D₂ aus Ergosterol über UV-Bestrahlung, und die Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation ausgehend von Ergosterol.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mikroorganismen, insbesondere Hefestämme, die durch Überexpression der im Verfahren unter a-i) genannten Gene eine erhöhte Menge an Ergosterol und Ergosterol in Kombination mit erhöhten Mengen an Squalen herstellen können.

Bevorzugt ist eine veränderte Variante des Gens *HMG1*, in dem nur der katalytische Bereich ohne die membrangebundene Domäne exprimiert wird. Diese Veränderung ist beschrieben (EP-0486 290).

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die im Verfahren unter a), insbesondere die im Verfahren unter a-i) bis a-vii) genannten Gene (zwei-, drei-, vierfache Gen-Kombination) mit den Plasmiden zunächst jeweils unabhängig voneinander in Mikroorganismen gleicher Spezies einführt und mit diesen gemeinsam eine Fermentation zu Ergosterol durchführt und



das so erhaltene Ergosterol aus den Zellen extrahiert, analysiert und mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator und das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*- Promotor und dem *TRP*-Terminator und Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator, das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator und das *ERG9*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

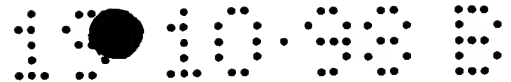
Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Kombination aus Expressionskassetten, wobei die Kombination aus

- a) einer ersten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
- b) einer zweiten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *SAT1*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
- und
- c) einer dritten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *ERG9*-Gen mit dem *TRP*-Terminator lokalisiert ist,

besteht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung dieser Expressionskassetten zur Transformation von Mikroorganismen, die bei der Fermentation zu Ergosterol eingesetzt werden, wobei die Mikroorganismen vorzugsweise Hefen sind.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismen, wie Hefen, die diese Expressionskassetten enthalten, sowie deren Verwendung bei der Fermentation zu Ergosterol und Ergosterol-Zwischenprodukten.



Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung im Hinblick auf die Durchführung der für die Ausführungsbeispiele notwendigen Verfahren:

1. Restriktion

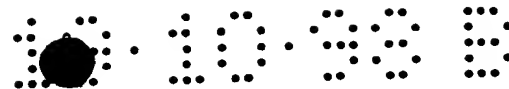
Die Restriktion der Plasmide (1 bis 10 µg) wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 24 µl H₂O aufgenommen, mit 3 µl des entsprechenden Puffers, 1 µl RSA (Rinderserumalbumin) und 2 µl Enzym versetzt. Die Enzymkonzentration betrug 1 Unit/µl oder 5 Units/µl je nach DNA-Menge. In einigen Fällen wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase zugegeben, um die tRNA abzubauen. Der Restriktionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Kontrolliert wurde die Restriktion mit einem Minigel.

2. Gelelektrophoresen

Die Gelelektrophoresen wurden in Minigel- oder Wide-Minigelapparaturen durchgeführt. Die Minigele (ca. 20 ml, 8 Taschen) und die Wide-Minigele (50 ml, 15 oder 30 Taschen) bestanden aus 1%iger Agarose in TAE. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Proben (10 µl) wurden mit 3 µl Stopperlösung versetzt und aufgetragen. Als Standard diente I-DNA geschnitten mit *Hind*III (Banden bei: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 min angelegt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt und unter UV-Licht mit dem Video-Dokumentationssystem INTAS festgehalten oder mit einem Orange-Filter fotografiert.

3. Gelelution

Mittels Gelelution wurden die gewünschten Fragmente isoliert. Der Restriktionsansatz wurde auf mehrere Taschen eines Minigels aufgetragen und aufgetrennt. Nur λ -*Hind*III und eine "Opferspur" wurden in Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht betrachtet und das gewünschte Fragment markiert. Dadurch wurde verhindert, daß die DNA der restlichen Taschen durch das Ethidiumbromid und das UV-Licht geschädigt wird. Durch Aneinanderlegen des gefärbten und ungefärbten Gelstücks konnte anhand der Markierung das gewünschte Fragment aus dem ungefärbten Gelstück herausgeschnitten werden.



Das Agarosestück mit dem zu isolierenden Fragment wurde in einen Dialyseschlauch gegeben, mit wenig TAE-Puffer luftblasenfrei verschlossen und in die BioRad-Minigelapparatur gelegt. Der Laufpuffer bestand aus 1 x TAE und die Spannung betrug 100 V für 40 min. Danach wurde für 2 min die Strompolarität gewechselt, um am Dialyseschlauch klebende DNA wieder zu lösen. Der die DNA-Fragmente enthaltende Puffer des Dialyseschlauches wurde in Reaktionsgefäße überführt und damit eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat, tRNA (1 µl pro 50 µl Lösung) und dem 2,5 fachen Volumen an eiskaltem 96%igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -20 °C inkubiert und dann bei 12000 rpm, 30 min, 4 °C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 bis 50 µl H₂O (je nach DNA-Menge) aufgenommen.

4. Klenow-Behandlung

Durch die Klenow-Behandlung werden überstehende Enden von DNA-Fragmenten aufgefüllt, so daß "blunt-ends" entstehen. Pro 1 µg DNA wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

DNA-Pellet	+ 11 µl	H ₂ O
	+ 1,5 µl	10 x Klenow Puffer
	+ 1 µl	0,1 M DTT
	+ 1 µl	Nucleotide (dNTP 2 mM)
	+ 1 µl	Klenow-Polymerase (1Unit/µl)

Die DNA sollte dabei aus einer Ethanolfällung stammen, um zu verhindern, daß Verunreinigungen die Klenow-Polymerase hemmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, durch weitere 5 min bei 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt. Die DNA wurde aus dem Ansatz durch eine Ethanolfällung gewonnen und in 10 µl H₂O aufgenommen.

5. Ligation

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden vereinigt. Das Endvolumen von 13,1 µl enthielt ca. 0,5 µg DNA mit einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:5. Die Probe wurde 45 Sekunden bei 70 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 3 min) und



dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ligationspuffer zugegeben: 2,6 µl 500 mM TrisHCl pH 7,5 und 1,3 µl 100 mM MgCl₂ und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 500 mM DTT und 1 µl 10 mM ATP und nochmaligen 10 min auf Eis wurde 1 µl Ligase (1Unit/µl) zugegeben. Die ganze
5 Behandlung sollte möglichst erschütterungsfrei erfolgen, um aneinanderliegende DNA-Enden nicht wieder zu trennen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

6. *E. coli*-Transformation

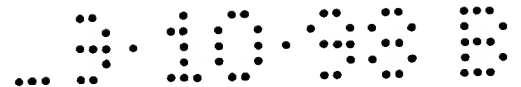
10

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) NM522 Zellen wurden mit der DNA des Ligationsansatzes transformiert. Als Positiv-Kontrolle lief ein Ansatz mit 50 ng des pScL3 Plasmids und als Null-Kontrolle ein Ansatz ohne DNA mit. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl 8% PEG-Lösung, 10 µl DNA und 200 µl
15 kompetente Zellen (*E. coli* NM522) in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min in Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt. Danach erfolgte der Hitzeschock: 1 min bei 42 °C. Für die Regeneration wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Je 100 µl der unverdünnten Ansätze, einer 1:10 Verdünnung und einer 1:100
20 Verdünnung wurden auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

7. Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Minipräp)

25

E. coli -Kolonien wurden über Nacht in 1,5 ml LB + Ampicillin-Medium in Tischzentrifugenröhrchen bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Jeder Ansatz wurden mit 100 µl 0,2 N NaOH, 1% SDS-
30 Lösung versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis gestellt (Lyse der Zellen). Danach wurden 400 µl Na-Acetat/NaCl-Lösung (230 µl H₂O, 130 µl 3 M Natriumacetat, 40 µl 5 M NaCl) zugegeben, der Ansatz gemischt und für weitere 15 min auf Eis gestellt (Proteinfällung). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein Eppendorfgefäß überführt. War der
35 Überstand nicht vollständig klar, wurde nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert (DNA-Fällung). Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl eisgekühltem 96%igem Ethanol



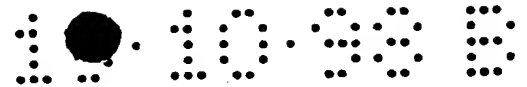
gewaschen, 15 min bei -20 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde im Speed Vac getrocknet und dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Dazu wurden 10 µl jedes Ansatzes restringiert und in einem Wide-Minigel
 5 gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe oben).

8. Plasmid-Aufarbeitung aus *E. coli* (Maxipräp)

10 Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräp-Methode durchgeführt. Zwei Kolben mit 100 ml LB + Ampicillin-Medium wurden mit einer Kolonie bzw. mit 100 µl einer Gefrierkultur, die das zu isolierende Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Die Anzucht (200 ml) wurde am nächsten Tag in einen GSA-Becher überführt und bei 4000 rpm (2600 x g)
 15 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml TE-Puffer aufgenommen. Zum Abdau der Zellwand wurden 1,2 ml Lysozymlösung (20 mg/ml TE-Puffer) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 12 ml 0,2 N NaOH, 1% SDS-Lösung und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 9 ml gekühlter 3 M
 20 Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (GSA: 13000 rpm (27500 x g), 20 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die DNA enthielt, in einen neuen GSA-Becher überführt und die DNA mit 15 ml eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Ethanol gewaschen und an der Luft
 25 getrocknet (ca. 30 - 60 min). Danach wurde es in 1 ml H₂O aufgenommen. Es fand eine Überprüfung des Plasmids durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdünnungen auf einem Minigel bestimmt. Zur Verringerung des Salzgehaltes erfolgte eine 30 - 60 minütige Mikrodialyse (Porengröße 0,025-µm).

9. Hefe-Transformation

Für die Hefe-Transformation wurde eine Voranzucht des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) AH22 angesetzt. Ein Kolben mit 20 ml YE-Medium wurde
 35 mit 100 µl der Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 120 rpm bebrütet. Die Hauptanzucht erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kolben mit 100 ml YE-Medium, die mit 10 µl, 20 µl oder 50 µl der Voranzucht angeimpft wurden.



9.1 Erstellen kompetenter Zellen

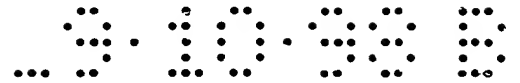
Am nächsten Tag wurden die Kolben mittels Thomakammer ausgezählt und es wurde mit dem Kolben, der eine Zellzahl von $3 - 5 \times 10^7$ Zellen/ml besaß weitergearbeitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GSA: 5000 rpm (4000 x g), 10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und auf zwei Tischzentrifugenröhrchen aufgeteilt (je 5 ml). Die Zellen wurden 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und noch zweimal mit je 5 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 330 µl Lithiumacetat-Puffer pro 10^9 Zellen aufgenommen, in einen sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und eine Stunde bei 28 °C geschüttelt. Dadurch waren die Zellen kompetent für die Transformation.

9.2 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 15 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml), 10 µl zu transformierende DNA (ca. 0,5 µg) und 330 µl kompetente Zellen in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert und 30 min bei 28 °C (ohne Schütteln!) inkubiert. Danach wurden 700 µl 50% PEG 6000 zugegeben und für eine weitere Stunde bei 28 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei 42 °C. 100 µl der Suspension wurden auf Selektionsmedium (YNB, Difco) ausplattiert, um auf Leucinprototrophie zu selektionieren. Im Falle der Selektion auf G418 Resistenz wird nach dem Hitzeschock eine Regeneration der Zellen durchgeführt (s. unter 9.3 Regenerationsphase)

9.3 Regenerationsphase

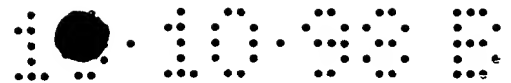
Da der Selektionsmarker die Resistenz gegen G418 ist, brauchten die Zellen Zeit für die Expression des Resistenz-Gens. Die Transformationsansätze wurden mit 4 ml YE-Medium versetzt und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min) in 1 ml YE-Medium aufgenommen und davon 100 µl bzw. 200 µl auf YE + G418-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 28 °C bebrütet.



10. Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen für die Polymerase Chain Reaction müssen für den Einzelfall optimiert werden und sind nicht uneingeschränkt für jeden Ansatz gültig.

- 5 So kann unter anderem die eingesetzte Menge an DNA, die Salzkonzentrationen und die Schmelztemperatur variiert werden. Für unsere Problemstellung erwies es sich als günstig, in einem Eppendorfhütchen, das für den Einsatz im Thermocycler geeignet war, folgende Substanzen zu vereinigen: Zu 2 μl ($\sim 0,1$ U) Super Taq Polymerase wurden 5 μl Super Buffer, 8 μl dNTP's (je 0,625 μM), 5'-Primer, 3'-
- 10 Primer und 0,2 μg Matritzen DNA, gelöst in soviel Wasser, daß sich ein Gesamtvolumen von 50 μl für den PCR Ansatz ergibt, zugegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet. Es wurden zwischen 37 und 40 Zyklen zur Amplifizierung gewählt.



Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele beschreiben die Herstellung der erfindungsgemäßen Plasmide und Hefestämme sowie deren Verwendung, ohne jedoch die Erfindung auf diese Beispiele einzuschränken.

5 Beispiel 1

Expression der *tHMG* in *S. cerevisiae* AH22

Die DNA-Sequenz für *tHMG* (Basson et al., (1988)) wurde durch PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* S288C (Mortimer und Johnston, (1986)) unter Anwendung von Standardmethoden amplifiziert. Die hierbei
 10 verwendeten Primer sind die DNA Oligomere *tHMG*-5' und *tHMG*-3' (s. Seq ID Nos. 1 und 2). Das erhaltene DNA-Fragment wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Klonierungsvektor pUC19 (Yanisch-Perron et al., (1985)) eingebracht und ergab den Vektor pUC19-*tHMG*. Nach Plasmidisolation und Restriktion von pUC19-*tHMG* mit den Endonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI wurde das gewonnene Fragment in den
 15 Hefeexpressionsvektor pPT2b (Lang und Looman, (1995)), der ebenfalls mit *Eco*RI und *Bam*HI behandelt wurde, eingebracht. Das entstandene Plasmid pPT2b-*tHMG* enthält den *ADH1*-Promotor (Bennetzen und Hall, (1982)) und den *TRP1*-Terminator (Tschumper und Carbon, (1980)), zwischen denen sich das *tHMG*-DNA-Fragment befindet. Aus dem Vektor pPT2b-*tHMG* wurde über die Endonucleasen *Eco*RV und
 20 *Nru*I ein DNA-Abschnitt isoliert, die den sogenannten mittleren *ADH1*-Promotor, die *tHMG* und dem *TRP1*-Terminator enthält. Dieser DNA-Abschnitt wurde in den Hefe-Vektor YEp13 (Fischhoff et al., (1984)), der mit der Endonuklease *Sph*I und einer DNA-Polymerase behandelt wurde, eingebracht. Der dadurch entstandene Vektor, der YEpH2 (Fig. 1), wurde mit den Endonukleasen *Eco*RV und *Nru*I behandelt. Es
 25 entstand so ein DNA-Fragment mit folgenden Bereichen: ein transkriptionsaktivierender Bereich aus dem Tetracyclinresistenzgen (Sidhu und Bollon, (1990)), dem mittleren *ADH1*-Promotor, der *tHMG* und dem *TRP1*-Terminator (Expressions-kassette). Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor YDpU (Berben et al., (1991)), der mit *Stu*I behandelt wurde, eingebracht. Der so entstandene Vektor YDpUH2/12
 30 wurde mit der Endonuklease *Sma*I behandelt und mit einer DNA-Sequenz ligiert, die für eine Kanamycinresistenz kodiert (Webster und Dickson, (1983)). Das entstandene Konstrukt (YDpUHK3, Fig. 2) wurde mit *Eco*RV behandelt. Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22 wurde mit diesem Konstrukt transformiert. Die Transformation der Hefe mit einem linearisierten Vektor, wie er in
 35 diesem Beispiel vorliegt, führt zu einer chromosomalen Integration des gesamten Vektors am *URA3* Genlocus. Um die Bereiche aus dem integrierten Vektor zu



- eliminieren, die nicht zu der Expressionskassette gehören (*E.coli*-origin, *E.coli*-Ampicillin-Resistenzgen, TEF-Promotor und Kanamycin-Resistenzgen), wurden transformierte Hefen mittels FOA-Selektion (Boeke et al., (1987)) einem Selektionsdruck unterzogen, der Uracil-auxotrophe Hefen begünstigt. Der aus der Selektion hervorgegangene, Uracil-auxotrophe Stamm trägt die Bezeichnung AH22/tH3ura8 und besitzt die *tHMG1*-Expressionskassette als chromosomale Integration im *URA3*-Gen.

Der Hefestamm AH22/tH3ura8 und der Ausgangsstamm AH22 wurden 48 Stunden lang in YE bei 28°C und 160 rpm in Schikanekolben kultiviert.

- Kultivierungsbedingungen: Die Vorkultur WMVIII wurde wie folgt angesetzt: 20 ml WMVIII + Histidin (20 µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) wurden mit 100 µl Gefrierkultur angeimpft und 2 Tage bei 28°C und 120 rpm (reziprok) inkubiert. Aus der 20 ml Vorkultur wurden 100 ml WMVIII + Histidin (20 µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) angeimpft. Für die Hauptkultur wurden 50 ml YE (in 250 ml Schikanekolben) mit 1×10^9 Zellen beimpft. Die Kolben wurden bei 160 rpm auf einem Rundschüttler bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. HMG-CoA-Reduktaseaktivitäten wurden (nach Qureshi et al., (1981)) bestimmt und ergaben folgenden Werte (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

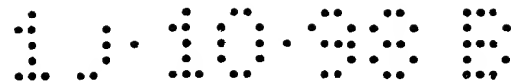
	spezifische HMG-CoA-Reduktase-Aktivität* (U/mg Protein)
AH22	3,99
AH22/tH3ura8	11,12

*Ein Unit ist definiert als die Umsetzung von 1nmol NADPH pro Minute in einem Milliliter Reaktionsgemisch. Die Messung erfolgte mit Gesamtproteinisolaten.

- Die Sterole wurden extrahiert (Parks et al., (1985)) und über Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (s. Tabelle 2).

Tabelle 2

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22	0,01794	1,639
AH22/tH3ura8	0,8361	1,7024



Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

Beispiel 2

Expression der *SAT1* in *S. cerevisiae* AH22

- 5 Die Sequenz für die Acyl-CoA: Steroltransferase (*SAT1*; Yang et al., (1996)) wurde, wie oben beschrieben, durch PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* S288C gewonnen. Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere SAT1-5' und SAT1-3' (s. Seq ID Nos. 3 und 4). Das erhaltene DNA-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T (Mezei und Storts, (1994)) kloniert, was zum Vektor pGEM-SAT1 führte. Durch Behandlung von pGEM-SAT1 mit *EcoRI* erhielt man ein Fragment, das in den Hefeexpressionsvektor pADH1001, der ebenfalls mit *EcoRI* behandelt wurde, kloniert wurde. Der so entstandene Vektor pADH-SAT1 wurde mit der Endonuklease *NruI* behandelt und mit einem Fragment aus YEp13, der das *LEU2*-Gen enthält, ligiert.
- 15 So entstand der Hefeexpressionsvektor pADL-SAT1 (Fig. 3), der in den Hefestamm AH22 eingebracht wurde. Der so gewonnene Stamm AH22/pADL-SAT1 wurde 7 Tage in WMVIII (Lang und Looman (1995)) Minimalmedium inkubiert. Kultivierungsbedingungen: (Zur Vorkultur s.o.) Hauptkultur: 50 ml WMVIII + Histidin (20 µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) Kulturen (in 250 ml Schikanekolben) wurden mit
- 20 1×10^9 Zellen beimpft: Die Kolben wurden bei 160 rpm auf einem Rundschtüttler bei 28°C für 7 Tage inkubiert. Die gebildeten Sterole wurden über Gaschromatographie analysiert (s. Tabelle 3).

Tabelle 3

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22	n.d.	1,254
AH22/ pADL-SAT1	n.d.	1,831

Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.
n.d.: nicht bestimmbar

Beispi I 3

Kombinierte Expression der verkürzten 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (*tHMG*) und der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)

Der Hefestamm AH22/tH3ura8 wurde mit dem *SAT1*-Expressionsvektor pADL-SAT1 transformiert und ergab AH22/tH3ura8/pADL-SAT1. Dieser kombinierte Stamm wurde 7 Tage in WMVIII kultiviert. Die Sterole wurden extrahiert (s.o.) und über Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (s. Tabelle 4).

Tabelle 4

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22/tH3ura8	1,602	3,798
AH22/tH3ura8/pADL-SAT1	1,049	5,540

Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

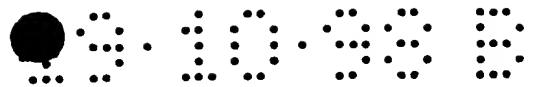
Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das Plasmid YEpH2 mit den entsprechenden Schnittstellen.

Fig. 2 zeigt das Plasmid YDpUHK3 mit den entsprechenden Schnittstellen.

5 Fig. 3 zeigt das Plasmid pADL-SAT1 mit den entsprechenden Schnittstellen.





Literaturzitate

Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Rine, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3793-3808.

Bennetzen, J. L., Hall, B. D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 257: 3018-3025.

Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., Hilger, F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 475-477.

Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. (1987) 5-Fluorootic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* 154: 164-175.

Fegueur, M., Richard, L., Charles, A.D., Karst, F. (1991) Isolation and primary structure of the ERG9 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding squalene synthetase. *Current Genetics* 20: 365-372.

Fischhoff, D. A., Waterston, R. H., Olson, M. V. (1984) The yeast cloning vector YEp13 contains a tRNA^{Leu3} gene that can mutate to an amber suppressor. *Gene* 27: 239-251.

Jandrositz, A., Turnowsky, F., Högenauer, G. (1991) The gene encoding squalen epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Gene* 107: 155-160.

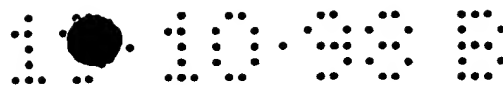
Mezei, L. M., Storts, D. R. (1994) in: PCR technology: current innovations, Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds. CRC Press, Boca Raton, 21.

Mortimer, R. K., Johnston, J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43.

Lang C., Looman A.C. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 147-156.

Parks LW, Bottema CDK, Rodriguez RJ, Lewis TA (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. *Meth. Enzymol.* 111: 333-346.

Qureshi, N., Nimmannit, S., Porter, J. W. (1981) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Yeast. *Meth. Enzymol.* 71: 455-461.



Ruohonen, L., Aalto, M.K., Keranen, S. (1995) Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 39: 193-203.

- 5 Siduh, R. S., Bollon, A. P. (1990) Bacterial plasmid pBR322 sequences serve as upstream activating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 221-229.

Tschumper, G., Carbon, J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the *TRP1* gene. *Gene* 10: 157-166.

10

Webster, T. D., Dickson, R. C. (1983) Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. *Gene* 26: 243-252.

15

Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R., Sturley, S. L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science* 272: 1353-1356.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. *Gene* 33 (1985) 103-119.

20

Yu, C., Rothblatt, J.A. Cloning and characterisation of the *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase (1996), *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 24157-24163.

25



SEQUENCE LISTING

5 (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Schering AG

10 (B) STREET: Müllerstrasse 178

(C) CITY: Berlin

(E) COUNTRY: Germany

(F) POSTAL CODE (ZIP): D-13342

15 (G) TELEPHONE: (030)-4681 2085

(H) TELEFAX: (030)-4681 2058

(ii) TITLE OF INVENTION: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON
ERGOSTEROL UND DESSEN ZWISCHENPRODUKTEN MITTELS
REKOMBINANTER HEFEN

20

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

25 (B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 1:

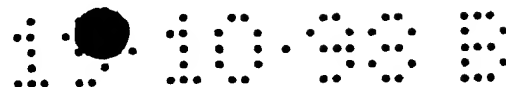
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 bases

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear



(ii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

5'- ACTATGGACC AATTGGTGAA AACTG

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 2:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 bases

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) HYPOTHETICAL: NO

20 (iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 2:

5'- AGTCACATGG TGCTGTTGTG CTT

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 bases

30

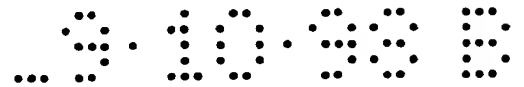
(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) HYPOTHETICAL: NO



(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 3:

5'- GAATTCAACC ATGGACAAGA AGAAG

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 24 bases

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

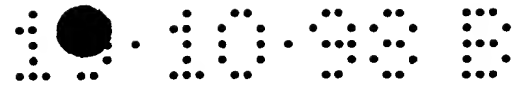
15

(ii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 4:

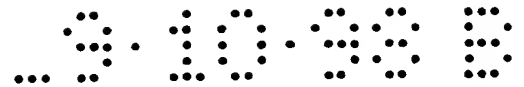
20

5'- AGAATTCCAC AGAACAGTTG CAGG

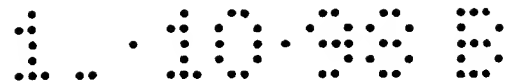


Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem mehrere geeignete Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form inseriert sind
oder
b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form inseriert ist,
c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a-i) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene inseriert sind:
i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*),
ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG 1*),
oder
a-ii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene inseriert sind:
i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
und



- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*),
- oder
- a-iii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (t-*HMG*)
- und
- iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),
- oder
- a-iv) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (t-*HMG*)
- und
- iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
- oder
- a-v) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
- und
- iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),
- oder
- a-vi) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
- und
- iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
- oder
- a-vii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
- und
- iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
- oder
- b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der unter a-i) genannten Gene insertiert ist,
- und
- c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a-i) bis a-vii)



transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,

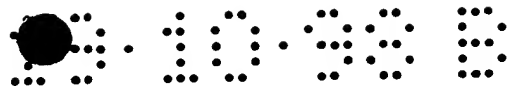
- d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
- e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
- f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Plasmid unter a-ii), a-iii) und a-v) zusätzlich das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) und auf dem Plasmid a-ii) zusätzlich das Gen der Acyl-CoA: Sterol-Acyl-transferase inseriert ist.

4. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man die in Anspruch 1 unter a), die in Anspruch 2 unter a-i) bis a-vii) und die in Anspruch 3 unter a-ii), a-iii) und a-v) genannten Gene mit den Plasmiden zunächst jeweils unabhängig voneinander in Mikroorganismen gleicher Spezies einführt und mit diesen gemeinsam eine Fermentation zu Ergosterol durchführt und das so erhaltene Ergosterol aus den Zellen extrahiert, analysiert und mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol sind.

6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Sterole mit 5,7-Dienstruktur sind.



7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide die Plasmide YEpH2, YDpUHK3 und pADL-SAT1 sind.

8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Hefen sind.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es die Spezies *S. cerevisiae* ist.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es der Stamm *S. cerevisiae* AH22 ist.

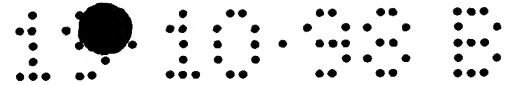
11. Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, enthaltend eines oder mehrerer der im Verfahren unter a-i) genannten Gene.

12. Plasmid YEpH2, bestehend aus dem mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und dem *TRP*-Terminator (Fig. 1).

13. Plasmid YDpUHK3, bestehend aus dem mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und dem *TRP*-Terminator, dem Gen für die Kanamycin-Resistenz und dem *ura3* Gen (Fig. 2).

14. Plasmid pADL-SAT1, bestehend aus dem *SAT1*-Gen und dem *LEU2*-Gen aus YEp13.

15. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung von Ergosterol.



16. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung der Ergosterol - Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol.

5

17. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung von Sterolen mit 5,7-Dienstruktur.

10

18. Expressionskassette, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator und das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

15

19. Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator, das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator und das *ERG9*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

20

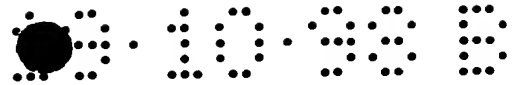
20. Kombination aus Expressionskassetten, wobei die Kombination aus
- a) einer ersten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
 - b) einer zweiten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *SAT1*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
- und
- c) einer dritten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *ERG9*-Gen mit dem *TRP*-Terminator lokalisiert ist.

30

21. Verwendung der Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 18 bis 20, zur Transformation von Mikroorganismen, die bei der Fermentation zu Ergosterol eingesetzt werden.

35

22. Verwendung gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus Hefe ist.



23. Mikroorganismen, enthaltend Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 18 bis 20.

5 24. Mikroorganismus gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß es Hefe ist.

10 25. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 23 und 24, bei der Fermentation zu Ergosterol.



15

26. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 23 und 24, bei der Fermentation zu Ergosterol-Zwischenprodukten.



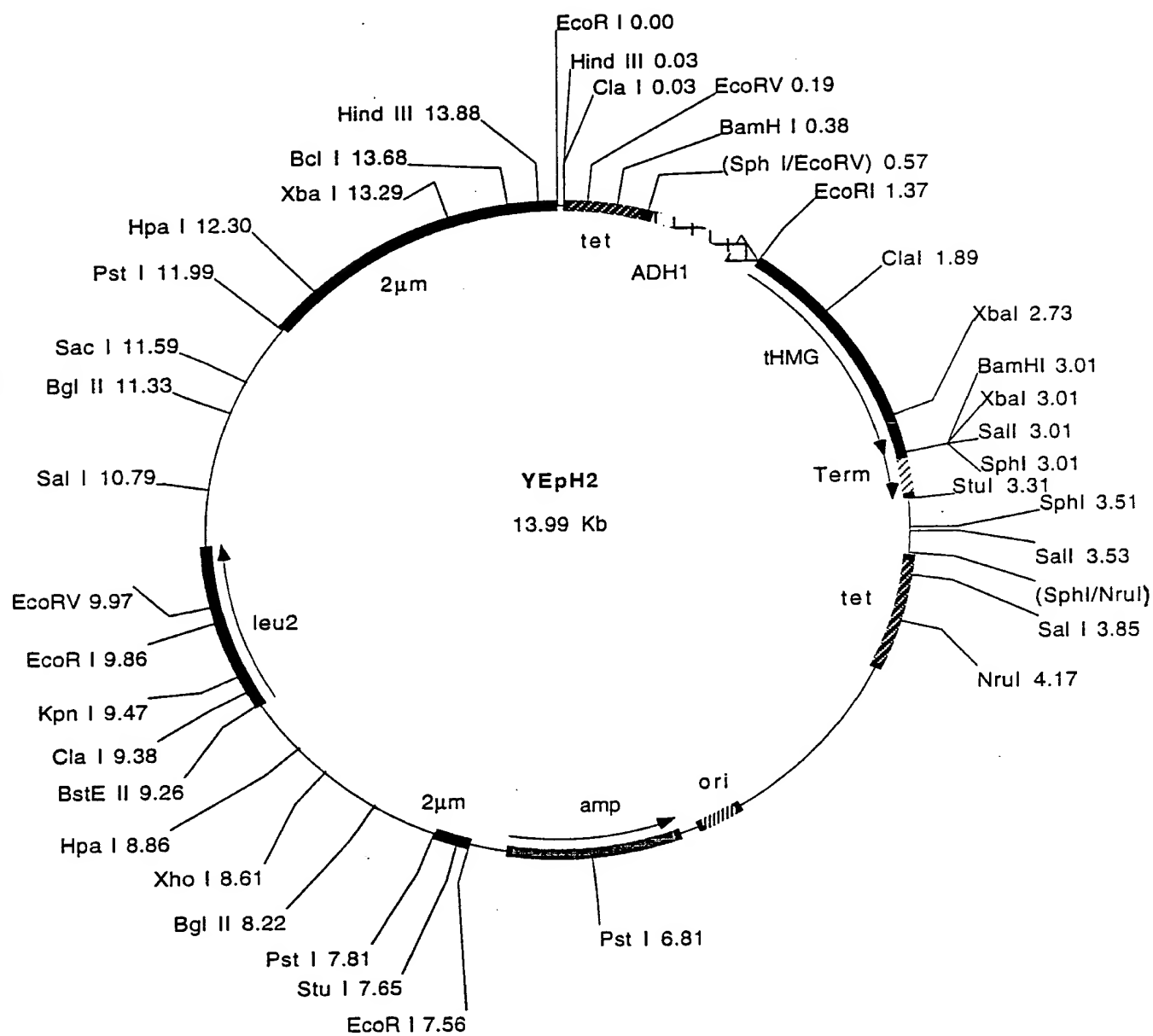
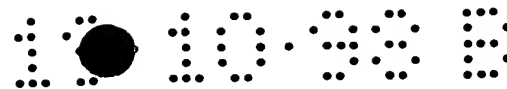
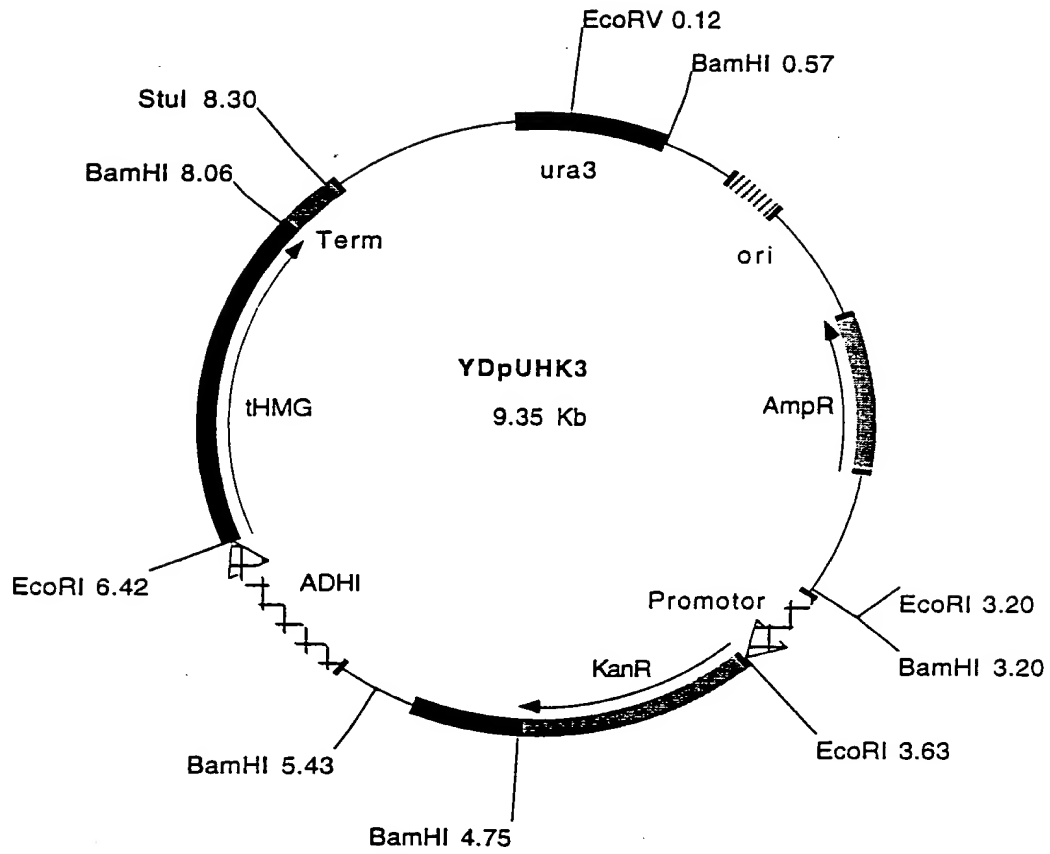
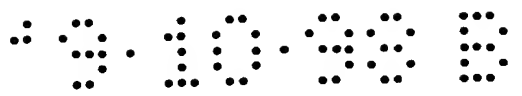


Fig. 1

**Fig. 2**

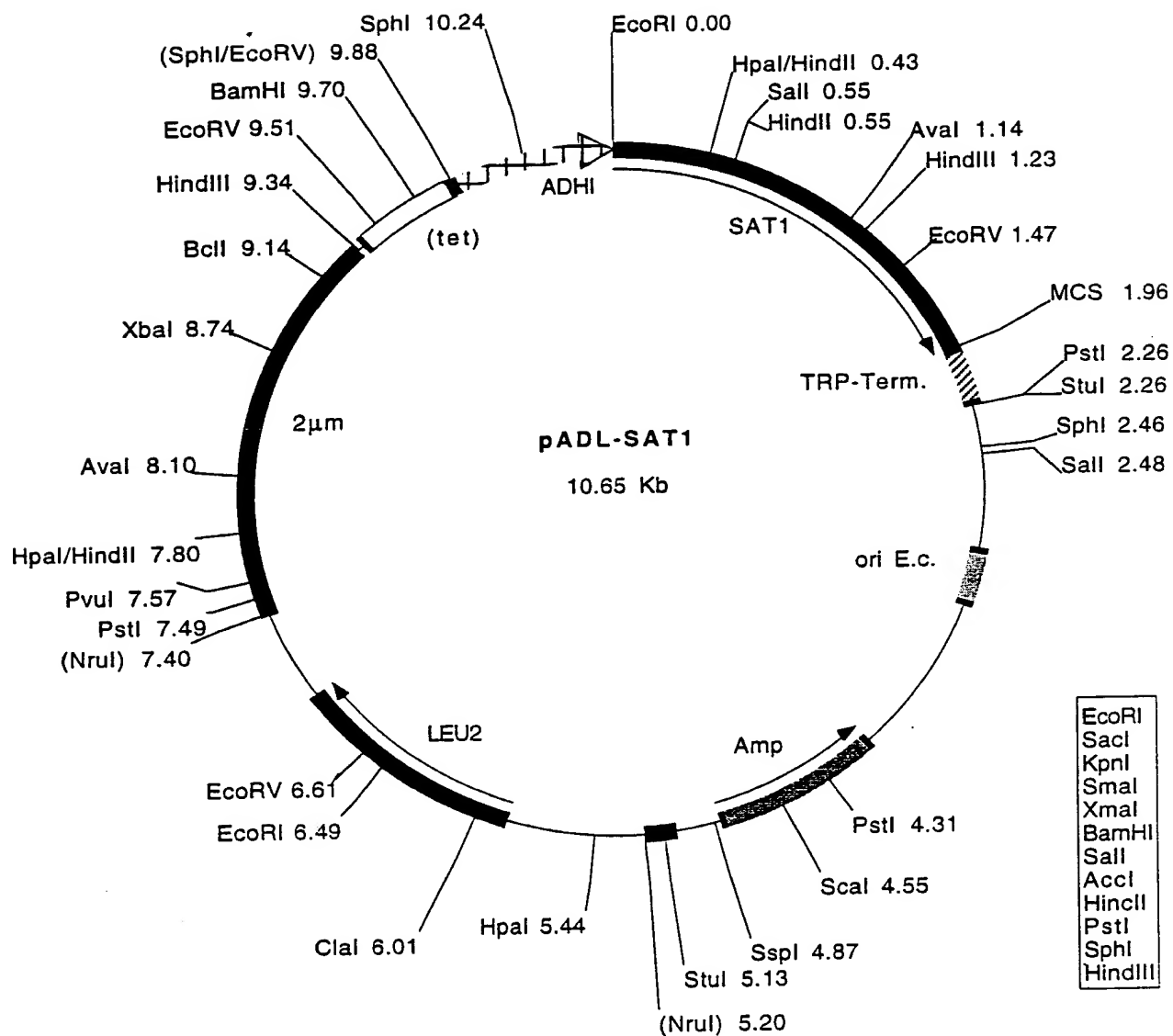
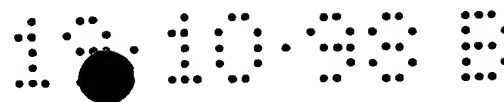
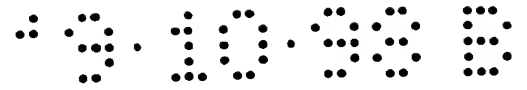


Fig. 3



Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen und Plasmiden zur Transformation von Hefen beschrieben.